

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

|  |  |
|--|--|
| <b>Date of mailing (day/month/year)</b><br>01 March 2001 (01.03.01)          | <b>Applicant's or agent's file reference</b><br>1222             |
| <b>International application No.</b><br>PCT/JP00/04535                       | <b>Priority date (day/month/year)</b><br>07 July 1999 (07.07.99) |
| <b>International filing date (day/month/year)</b><br>07 July 2000 (07.07.00) |  |
| <b>Applicant</b><br>SAITOH, Chiaki et al                                     |  |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 02 February 2001 (02.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|  |   |
|--|---|
| <b>The International Bureau of WIPO</b><br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | <b>Authorized officer</b><br><br>Antonia Muller |
| Facsimile No.: (41-22) 740.14.35   | Telephone No.: (41-22) 338.83.38                |



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04535

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/64, C07C59/42, C12P17/06, A23L1/03 // (C12P7/64, C12R1:01),  
(C12P17/06, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IntCl<sup>7</sup> C12P7/64, C07C59/42, C12P17/06, A23L1/03

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
REGISTRY (STN) , CA (STN) , WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALIG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | EP, 409321, A (QUEST INT BV),<br>23 October, 1991 (23.10.91),<br>& CA, 2021270, A & JP, 3-219886, A<br>& US, 5215901, A & DE, 69012471, E                           | 1-44                  |
| A         | EP, 412880, A (PERNOD RICARD SA),<br>13 February, 1991 (13.02.91),<br>& JP, 3-187387, A & IT, 1232906, B<br>& US, 5168054, A & DE, 69023715, E<br>& ES, 2080135, T3 | 1-44                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 October, 2000 (06.10.00)

Date of mailing of the international search report  
17 October, 2000 (17.10.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04535

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Inventions as set forth in claims 1 to 10 and 12 to 44 pertain to processes for producing [n-5]-hydroxyfatty acids having a single bond at the [n-6]-position, etc.

2. Invention as set forth in claim 11 pertains to 13-hydroxy-6, 9-octadecadienoic acid.

There is no technical matter common to all of these inventions and thus the above groups of inventions 1 and 2 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

|                           |   |                         |
|---------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 1222    | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/JP00/04535  | 国際出願日<br>(日.月.年) 07.07.00                           | 優先日<br>(日.月.年) 07.07.99 |
| 出願人(氏名又は名称)<br>協和醗酵工業株式会社 |   |                         |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 請求の範囲1-10、12-44は、[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸の製造方法等に関するものである。
2. 請求の範囲11は、13-ヒドロキシ-6,9-オクタデカジエン酸に関するものである。

上記請求の範囲の全てに共通の事項はなく、上記1~2の発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



|  |  |   |
|--|--|---|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  |  |   |
| Int. Cl <sup>7</sup> C12P 7/64, C07C 59/42, C12P 17/06, A23L 1/03 // (C12P 7/64, C12R 1:01), (C12P 17/06, C12R 1:645)  |  |   |
| B. 調査を行った分野  |  |   |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))   |  |   |
| Int. Cl <sup>7</sup> C12P 7/64, C07C 59/42, C12P 17/06, A23L 1/03  |  |   |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの   |  |   |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  |  |   |
| REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)  |  |   |
| C. 関連すると認められる文献  |  |   |
| 引用文献の<br>カテゴリー*  | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号  |
| A  | EP, 409321, A (QUEST INT BV) 23. 10月. 1991 (23. 10. 91)<br>& CA, 2021270, A & JP, 3-219886, A & US, 5215901, A<br>& DE, 69012471, E                      | 1-44  |
| A  | EP, 412880, A (PERNOD RICARD SA) 13. 2月. 1991 (13. 02. 91)<br>& JP, 3-187387, A & IT, 1232906, B & US, 5168054, A<br>& DE, 69023715, E & ES, 2080135, T3 | 1-44  |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。   |  |   |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献<br>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |  |   |
| 国際調査を完了した日   | 06. 10. 00   | 国際調査報告の発送日  |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/JP)<br>郵便番号 100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号  |  | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>高堀 栄二<br>4B 9281<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |



# PCT

## REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum)

1222

**Box No. I TITLE OF INVENTION**  
PROCESS FOR PRODUCING HYDROXYLATED FATTY ACIDS  
AND  $\delta$ -LACTONES

**Box No. II APPLICANT**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185 Japan

☐ This person is also inventor.

Telephone No. 03-3282-0036

Facsimile No. 03-3282-1527

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

JP

State (that is, country) of residence:

JP

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☒ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

**Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SAITOH Chiaki  
c/o Foods & liquors Research Laboratories  
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
4041, Ami, Ami-machi, Inashiki-gun  
Ibaraki 300-0398 Japan

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JP

State (that is, country) of residence:

JP

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

**Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☐ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.



| Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)  |  |  |  |
|--|--|--|--|
| <i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request</i>  |  |  |  |
| Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i><br><br><b>MASUDA Yukiko</b><br><b>c/o Foods &amp; Liquors Research Laboratories</b><br><b>KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.</b><br><b>4041, Ami, Ami-machi, Inashiki-gun</b><br><b>Ibaraki 300-0398 Japan</b>   |  | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> |  |
| State (that is, country) of nationality: <b>JP</b>   |  | State (that is, country) of residence: <b>JP</b>   |  |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box  |  |  |  |
| Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i><br><br><b>YASHIRO Atsushi</b><br><b>c/o Foods &amp; Liquors Research Laboratories</b><br><b>KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.</b><br><b>4041, Ami, Ami-machi, Inashiki-gun</b><br><b>Ibaraki 300-0398 Japan</b> |  | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> |  |
| State (that is, country) of nationality: <b>JP</b>   |  | State (that is, country) of residence: <b>JP</b>   |  |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box  |  |  |  |
| Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i><br><br><b>ISHIGURO Hiroki</b><br><b>c/o Tokyo Research Laboratories</b><br><b>KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.</b><br><b>6-6, Asahi-machi 3-chome, Machida-shi</b><br><b>Tokyo 194-8533 Japan</b>              |  | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i> |  |
| State (that is, country) of nationality: <b>JP</b>   |  | State (that is, country) of residence: <b>JP</b>   |  |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box  |  |  |  |
| Name and address: <i>(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i><br><br>(Empty)  |  | This person is:<br><input type="checkbox"/> applicant only<br><input type="checkbox"/> applicant and inventor<br><input type="checkbox"/> inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below.)</i>            |  |
| State (that is, country) of nationality:   |  | State (that is, country) of residence:   |  |
| This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box   |  |  |  |
| <input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.  |  |  |  |

100

100

100

100



**Box No.V DESIGNATION OF STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

**Regional Patent**

- ☒ **AP** **ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA** **Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** **European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA** **OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

**National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):**

- |  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> United Arab Emirates                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albania                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lithuania  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Austria                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australia                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Latvia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaijan                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MA</b> Morocco  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnia and Herzegovina               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> Republic of Moldova  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgaria                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> The former Yugoslav Republic of Macedonia                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brazil                               |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexico   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norway   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CR</b> Costa Rica                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> New Zealand  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Poland   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Czech Republic                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Germany                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Romania  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Denmark                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Russian Federation   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DM</b> Dominica                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Sweden   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Spain                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapore  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finland                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovenia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> United Kingdom                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovakia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenada                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tajikistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turkey   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Croatia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad and Tobago  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hungary                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TZ</b> United Republic of Tanzania                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesia                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> India                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> United States of America                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Iceland                              |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Uzbekistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kyrgyzstan                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yugoslavia   |
| <input type="checkbox"/> <b>KP</b> Democratic People's Republic of Korea           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> South Africa   |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republic of Korea                    | Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet: |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan                           | <input checked="" type="checkbox"/> Democratic People's Republic of Algeria                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia                          | <input checked="" type="checkbox"/> Belize   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka                            | <input checked="" type="checkbox"/> Antigua and Barbuda  |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> Mozambique   |

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)



| <b>Box No. VI PRIORITY CLAIM</b>  |                                     |  |  | <input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box. |  |
|---|-------------------------------------|--|--|---|--|
| Filing date of earlier application<br>(day/month/year)  | Number of earlier application       | Where earlier application is:  |  |   |  |
|   |                                     | national application:<br>country   | regional application:<br>regional Office | international application:<br>receiving Office  |  |
| item (1)<br>07.01.99  | Patent Application<br>No. 192684/99 | JP   |  |   |  |
| item (2)  |                                     |  |  |   |  |
| item (3)  |                                     |  |  |   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1) |                                     |  |  |   |  |
| <small>* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.</small>   |                                     |  |  |   |  |
| <b>Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY</b>  |                                     |  |  |   |  |
| Choice of International Searching Authority (ISA)<br><small>(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):</small><br>ISA/ JP  |                                     | Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):<br>Date (day/month/year)      Number      Country (or regional Office)  |  |   |  |
| <b>Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING</b>  |                                     |  |  |   |  |
| This international application contains the following number of sheets:<br>request : 4<br>description (excluding sequence listing part) : 23<br>claims : 7<br>abstract : 1<br>drawings : 0<br>sequence listing part of description : 0<br>Total number of sheets : 35   |                                     | This international application is accompanied by the item(s) marked below:<br>1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet<br>2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney<br>3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney, reference number, if any:<br>4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature<br>5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):<br>6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language):<br>7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material<br>8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form<br>9. <input type="checkbox"/> other (specify): |  |   |  |
| Figure of the drawings which should accompany the abstract:   |                                     | Language of filing of the international application: JAPANESE  |  |   |  |
| <b>Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT</b>   |                                     |  |  |   |  |
| <small>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</small>   |                                     |  |  |   |  |
| SAITOH Chiaki      YAMASHITA Yoshinori<br>KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD<br>MASUDA Yukiko      ISHIGURO Hiroki  |                                     |  |  |   |  |

|   |  |
|---|--|
| For receiving Office use only   |  |
| 1. Date of actual receipt of the purported international application:   | 2. Drawings:<br><br><input type="checkbox"/> received:<br><br><input type="checkbox"/> not received: |
| 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: |  |
| 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):  |  |
| 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/JP   |  |
| 6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.  |  |

|   |
|---|
| For International Bureau use only                               |
| Date of receipt of the record copy by the International Bureau: |

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

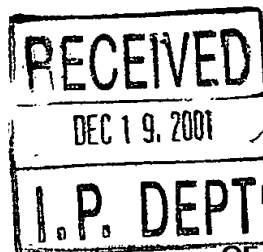
11.11.11

11.11.11

11.11.11

11.11.11

## PCT COOPERATION TREA



PCEHD

PCT

**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL  
OF COPIES OF TRANSLATION  
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
6-1, Ohtemachi 1-chome  
Chyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

|   |   |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year)<br>06 December 2001 (06.12.01) |   |
| Applicant's or agent's file reference<br>1222                   | <b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>   |
| International application No.<br>PCT/JP00/04535                 | International filing date (day/month/year)<br>07 July 2000 (07.07.00) |
| Applicant<br>KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al                  |   |

**1. Transmittal of the translation to the applicant.**

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

**2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.**

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,AU,CA,CH,CN,CZ,FI,NO,NZ,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AG,AL,AM,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CR,CU,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,PL,PT,SD,SE,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

**3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).**

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br>Eliott PERETTI |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35   | Telephone No. (41-22) 338.83.38      |



147

## 特 許 協 力 条 約

P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

|   |   |                         |
|---|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 1 2 2 2   | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/<br>IPEA/416）を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/JPO0/04535  | 国際出願日<br>(日.月.年) 07.07.00                             | 優先日<br>(日.月.年) 07.07.99 |
| 国際特許分類 (IPC)<br>Int. Cl' C12P 7/64, C07C 59/42, C12P 17/06, A23L 1/03 // (C12P 7/64, C12R 1:01), (C12P 17/06, C12R 1:645) |   |                         |
| 出願人 (氏名又は名称)<br>協和醗酵工業株式会社  |   |                         |

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - IV ☒ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☐ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☐ 国際出願に対する意見

|  |  |         |
|--|--|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日<br>02.02.01                                     | 国際予備審査報告を作成した日<br>09.03.01                             |         |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁 (IPEA/JP)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>高堀 栄二<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | 4B 9281 |

7

8



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- ☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- ☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
- ☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- ☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- ☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



## IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☒ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☐ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

1. 請求の範囲1-10、12-44は、 $[n-6]$ 位が単結合の $[n-5]$ -ヒドロキシ脂肪酸の製造方法等に関するものである。
2. 請求の範囲11は、13-ヒドロキシ-6,9-オクタデカジエン酸に関するものである。

上記請求の範囲の全てに共通の事項はなく、上記1～2の発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ に関する部分



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-44

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-44

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-44

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: EP, 409321, A(QUEST INT BV)23.10月.1991(23.10.91)

文献2: EP, 412880, A(PERNOD RICARD SA)13.2月.1991(13.02.91)

請求の範囲1-44に記載された発明は、国際調査報告に記載された何れの文献にも開示されておらず、新規性及び進歩性を有する。文献1-2には、請求の範囲1に記載された[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸の製造方法、13-ヒドロキシ-6,9-オクタデカジエン酸が記載されておらず、また、当業者といえども容易に想到し得ないものである。



11T

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

|  |   |   |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference<br>1222  | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |   |
| International application No.<br>PCT/JP00/04535  | International filing date (day/month/year)<br>07 July 2000 (07.07.00)   | Priority date (day/month/year)<br>07 July 1999 (07.07.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>C12P 7/64, C07C 59/42, C12P 17/06, A23L 1/03 // (C12P 7/64, C12R 1:01), (C12P 17/06, C12R 1:645) |   |   |
| Applicant<br>KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.   |   |   |

|  |  |
|--|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>  |  |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> |  |

|   |   |
|---|---|
| Date of submission of the demand<br>02 February 2001 (02.02.01) | Date of completion of this report<br>09 March 2001 (09.03.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP                         | Authorized officer  |
| Facsimile No.   | Telephone No.   |





## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04535

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

1

2

3

4

5

6

7

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04535

## IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

1. The subject matters of claims 1-10 and 12-44 relate to a process for producing an [n-5]-hydroxy fatty acid having a single bond at the [n-6] position, etc.
2. The subject matter of claim 11 relates to 13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid.

There is no matter common to all of the above claims, and it cannot be considered that the above groups 1 and 2 of inventions are a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. \_\_\_\_\_



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04535

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

|                               |        |      |     |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-44 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 1-44 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-44 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |

### 2. Citations and explanations

Document 1: EP, 409321, A (Quest Int BV), 23 October, 1991 (23.10.91)

Document 2: EP, 412880, A (Pernod Ricard SA), 13 February, 1991 (13.02.91)

The subject matters of claims 1-44 appear to be novel and to involve an inventive step since they are not disclosed in any of the documents cited in the ISR. Documents 1 and 2 do not describe the process for producing an [n-5]-hydroxy fatty acid having a single bond at the [n-6] position described in claim 1, or 13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid, and a person skilled in the art could have easily conceived of them.



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 1 月 18 日 (18.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/04339 A1

(51) 国際特許分類: C12P 7/64, C07C  
59/42, C12P 17/06, A23L 1/03 // (C12P 7/64, C12R 1:01)  
(C12P 17/06, C12R 1:645)

[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番  
1号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04535

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 斎藤 知明  
(SAITOH, Chiaki) [JP/JP]. 舩田 幸子 (MASUDA,  
Yukiko) [JP/JP]. 屋代 敦 (YASHIRO, Atsushi) [JP/JP];  
〒300-0398 茨城県稲敷郡阿見町阿見4041 協和醸酵  
工業株式会社 食品酒類研究所内 Ibaraki (JP). 石黒博  
樹 (ISHIGURO, Hiroki) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町  
田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京  
研究所内 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2000 年 7 月 7 日 (07.07.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/192684 1999 年 7 月 7 日 (07.07.1999) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵  
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING HYDROXYLATED FATTY ACID AND DELTA-LACTONE

(54) 発明の名称: 水酸化脂肪酸およびδ-ラクトン類の製造方法

(57) Abstract: A fatty acid which is a linear fatty acid having n carbon atoms (wherein n is an even number of 10 or more) and carrying a double bond at least at the [n-6]-position or a composition containing this fatty acid is treated with cells of a microorganism (or optionally processed culture broth thereof) having an activity of introducing hydroxy and hydrogen respectively into the [n-5]- and [n-6]-positions of a fatty acid which is a linear fatty acid having n carbon atoms (wherein n is an even number of 10 or more) and carrying a double bond at least at the [n-6]-position to convert the double bond at the [n-6]-position into a single bond, thereby forming an [n-5]-hydroxyfatty acid having a single bond at the [n-6]-position. Subsequently, the obtained [n-5]-hydroxyfatty acid is treated with cells of a microorganism (or optionally processed culture broth thereof) having an activity of β-oxidizing an [n-5]-hydroxyfatty acid having a single bond at the [n-6]-position and thus formed δ-lactone is collected.

(57) 要約:

n (nは10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の [n-6] 位が二重結合である脂肪酸の、[n-5] 位にヒドロキシを [n-6] 位に水素を導入し [n-6] 位を単結合とする活性を有する微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を、n (nは10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の [n-6] 位が二重結合である脂肪酸若しくは該脂肪酸を含む組成物に作用させ [n-6] 位が単結合の [n-5]-ヒドロキシ脂肪酸を生成させ、次いで、[n-6] 位が単結合の [n-5]-ヒドロキシ脂肪酸をβ酸化する活性を有する微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させ、生成するδ-ラクトン類を採取する。

WO 01/04339 A1



RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

添付公開 類:  
— 国際調査報告

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



## 明 細 書

### 水酸化脂肪酸および $\delta$ -ラクトン類の製造方法

#### 技術分野

本発明は、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸から $[n-6]$  位が単結合の $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸の製造方法に関する。また、本発明は、該脂肪酸から $\delta$ -ラクトン類の製造方法および $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物の製造方法に関する。

#### 背景技術

ラクトン類はフルーツ香やミルク香といった好ましい香気を付与するので多くの食品中に添加され使用されている重要な化合物である。しかし、ラクトン類は天然原料中には低濃度でしか存在しないことから、一般的には化学合成品が使用されている。

ラクトン類の微生物による生産方法としては、乳酸菌およびビフィズス菌 [ガストロエンテロロジー (Gastroenterology), 62, 430 (1972)]、コリネバクテリウム属細菌 [アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry), 45, 2025 (1981)]、シュードモナス属細菌 [アチーブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジクス (Archives of Biochemistry and Biophysics), 99, 249 (1962)] などの微生物がオレイン酸から $\gamma$ -デカラクトン前駆体である10-ヒドロキシオクタデカン酸を生成させる方法が知られている。また、10-ヒドロキシオクタデカン酸、ひまし油中のリシノール酸などの水酸化された脂肪酸を酵母によって $\gamma$ -ラクトン類に変換することが知られている (特開昭60-66991号公報、特開昭60-100508号公報)。

ラクトン類を生産する酵母であるスポロボロマイセス・オドルス (Sporobolomyces odorus) がリノール酸から $\delta$ -デカラクトンを生産することが

知られている。13-ヒドロキシ-9, 11-オクタデセン酸 (13-hydroxy-9Z, 11E-octadecadienoic acid) [コリオール酸 (coriolic acid)] から  $\delta$ -デカラクトンが生産されることから、その中間体として酵母がコリオール酸を生産することが推測されている [エー・シー・エス・シンポジウム・シリーズ, フレバー・プレカーサーズ (ACS SYMPOSIUM SERIES, flavor Precursors), 490, 46 (1992)]。

リノール酸を光酸素化あるいはダイズ・リポキシゲナーゼ処理して得られるヒドロペルオキシドを還元処理して得られるコリオール酸を前駆体にして、クラドスポリウム属細菌や酵母によって  $\delta$ -デカラクトンに変換する方法 (特開平3-187387号公報) は知られている。また、コリアリア・ネパレンシスの種子油に含まれるコリオール酸やメキシカン・ヤラップの根から抽出した11-ヒドロキシパルミチン酸を前駆体にして、クラドスポリウム属細菌 [ジャーナル・オブ・オルガニック・ケミストリー (Journal of Organic Chemistry), 54, 4979 (1989)] や酵母 [ジャーナル・オブ・オルガニック・ケミストリー (Journal of Organic Chemistry), 57, 1954 (1992)、特開平3-219886号公報] によって  $\delta$ -デカラクトンに変換する方法は知られている。

しかしながら、微生物によってそれぞれリノール酸と  $\alpha$ -リノレン酸から13-ヒドロキシ-9-オクタデセン酸 (13-hydroxy-9-octadecenoic acid) と13-ヒドロキシ-9, 15-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-9, 15-octadecadienoic acid) を生成させそれぞれ  $\delta$ -デカラクトンとジャスミンラクトンを製造する方法は知られていない。

#### 発明の開示

本発明の目的は、微生物により  $n$  ( $n$  は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸から  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$ -ヒドロキシ脂肪酸を製造する方法を提供することである。また本発明の目的は、微生物により該脂肪酸から  $\delta$ -ラクトン類を製造する方法および  $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物を提供

することである。

本発明は、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸の、 $[n-5]$  にヒドロキシを  $[n-6]$  位に水素を導入し  $[n-6]$  位を単結合とする活性を有する微生物（以下、第一の微生物という）の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸または該脂肪酸を含有する組成物に作用させ、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を生成させ、生成した  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を採取することを特徴とする  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸の製造方法に関する。

また、本発明は、式 (I)



で表される13-ヒドロキシー6,9-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid) に関する。

また、本発明は、第一の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸または該脂肪酸を含む組成物に作用させ  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸生成させ、次いで、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を $\beta$ 酸化する活性を有する微生物（以下、第二の微生物という）の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させ、生成する $\delta$ -ラクトン類を採取することを特徴とする、 $\delta$ -ラクトン類の製造方法に関する。

また、本発明は、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸を含有する組成物に、第一の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させ、

該組成物中に  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を形成させ、次いで第二の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させることを特徴とする  $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物の製造方法に関する。

さらに、本発明は、上記の製造方法で製造される  $\delta$ -ラクトン類または  $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物を食品に添加することを特徴とする、 $\delta$ -ラクトン類を含有する食品の製造方法に関する。

本発明において  $[n-m]$  位が二重結合であるとは、 $[n-m]$  位と  $[n-(m-1)]$  位との間が二重結合であることを意味する。

本発明の、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸としては、 $[n-6]$  位が二重結合、好ましくはシス体の二重結合である、モノエン脂肪酸、ジエン脂肪酸、トリエン脂肪酸等があげられる。

ジエン脂肪酸、トリエン脂肪酸等のポリエン脂肪酸としては、非共役ポリエン脂肪酸であることが好ましく、 $[n-9]$  位が二重結合、特にシス体の二重結合を有していることが好ましい。また、 $n$  が 12 以上の場合、 $\delta$ -ラクトン類を生成させるためには、 $[n-10]$  位以下は単結合の脂肪酸であることが好ましい。

$n$  は 10 以上の偶数であれば上限は特にないが、10 以上 32 以下が好ましく、12 以上 26 以下がより好ましく、16 以上 22 以下が特に好ましい。

モノエン脂肪酸としては、例えばデセン酸、ドデセン酸、テトラデセン酸、ヘキサデセン酸、オクタデセン酸、イコセン酸、ドコセン酸、テトラコセン酸、ヘキサコセン酸、オクタコセン酸、トリアコンテン酸、ドトリアコンテン酸、テトラトリアコンテン酸等があげられる。

ジエン脂肪酸としては、例えばデカジエン酸、ドデカジエン酸、テトラデカジエン酸、ヘキサデカジエン酸、オクタデカジエン酸、イコサジエン酸、ドコサジエン酸、テトラコサジエン酸、ヘキサコサジエン酸、オクタコサジエン酸、トリアコンタジエン酸、ドトリアコンタジエン酸、テトラトリアコンタジエン酸等があげられる。

トリエン脂肪酸としては、例えば、デカトリエン酸、ドデカトリエン酸、テ

トラデカトリエン酸、ヘキサデカトリエン酸、オクタデカトリエン酸、イコサトリエン酸、ドコサトリエン酸、テトラコサトリエン酸、ヘキサコサトリエン酸、オクタコサトリエン酸、トリアコンタトリエン酸、ドトリアコサトリエン酸、テトラトリアコンタトリエン酸等があげられる。

これら脂肪酸としては、例えば4-デセン酸、7, 10-ヘキサデカジエン酸、6, 10-ヘキサデカジエン酸、12-オクタデセン酸、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、11, 14-イコサジエン酸、5, 11, 14-イコサトリエン酸、8, 11, 14-イコサトリエン酸、ビスホモ $\gamma$ -リノレン酸、11, 14, 17-イコサトリエン酸、6, 9, 12, 15-オクタデカテトラエン酸、13, 16-ドコサジエン酸、7, 10, 13, 16-ドコサンテトラエン酸およびアラキドン酸があげられるが、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸および $\gamma$ -リノレン酸が好ましく、リノール酸および $\alpha$ -リノレン酸がより好ましい。

本発明では、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数)個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$ 位が二重結合である脂肪酸を含有する組成物も用いられる。該組成物としては、天然油脂、食品またはこれらの加水分解物等があげられる。

天然油脂としては、例えば東柏油、月見草種子油、大豆油、コーン油、サフラワー油、小麦胚芽油、米油、ごま油、なたね油、オリーブ油、あまに油、乳脂、牛脂、豚油、卵黄油、魚油、海草、藻類、糸状菌類、シダ類、原生動物類等があげられる。

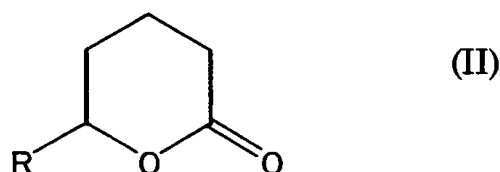
食品としては、豆乳等、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数)個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$ 位が二重結合である脂肪酸を含有する食品の他、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数)個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$ 位が二重結合である脂肪酸を含有しない食品に、該脂肪酸を添加して得られる食品があげられる。

天然油脂または食品の加水分解物は、天然油脂または食品に加水分解酵素等进行处理することにより得られる。

加水分解酵素としては、リパーゼ等があげられる。

組成物中の $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸の含量は、特に制限はないが、好ましくは0.01~99重量%、より好ましくは0.1~90重量%である。

本発明における $\delta$ -ラクトン類としては、例えば $\delta$ -デカラクトンまたはジャスミンラクトン等、式 (II)



(式中、 $R$ は $n$ -ペンチルまたは $n$ -ペンテニルを表す) で表される $\delta$ -ラクトン類があげられる。

本願発明で用いられる第一の微生物としては、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$  位が二重結合、好ましくはシス体の二重結合である脂肪酸の、 $[n-5]$  位にヒドロキシを $[n-6]$  位に水素を導入し $[n-6]$  位を単結合とする活性を有する微生物であればいずれも用いられるが、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸または $\gamma$ -リノレン酸の13位にヒドロキシを12位に水素を導入し12位を単結合とする活性を有する微生物であることが好ましい。

第一の微生物としては、例えば乳酸菌およびビフィズス菌があげられる。乳酸菌としては、例えばペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*) 等、ペディオコッカス属に属する微生物があげられる。ビフィズス菌としては、例えばビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) 等、ビフィドバクテリウム属に属する微生物があげられる。第一の微生物としては、ペディオコッカス・ペントサセウス IFO3891、ペディオコッカス・エスピー (*Pediococcus* sp.) IFO3778、ビフィドバクテリウム・ビフィダム JCM7002等が好適に用いられる。

本願発明で用いられる第二の微生物としては、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を  $\beta$  酸化する活性を有する微生物であれば、酵母等、いかなる微生物でも用いられる。

酵母としては、例えばクリベロマイセス属、ザイゴサッカロマイセス属、パフィア属またはサッカロマイセス属に属する微生物等があげられる。

クリベロマイセス属に属する微生物としては、例えばクリベロマイセス・マキシアンス (*Kluyveromyces marxianus*)、クリベロマイセス・サーモトレランス (*Kluyveromyces thermotolerans*)、クリベロマイセス・ウィッケラミイ (*Kluyveromyces wickerhamii*) 等、ザイゴサッカロマイセス属に属する微生物としては、例えばザイゴサッカロマイセス・ルキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*)、ザイゴサッカロマイセス・バイリー (*Zygosaccharomyces bailii*)、ザイゴサッカロマイセス・シードリ (*Zygosaccharomyces cidri*) 等、パフィア属に属する微生物としては、例えばパフィア・ジャジニー (*Pichia jadinii*) 等、サッカロマイセス属に属する微生物としては、例えばサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等があげられる。第二の微生物としては、例えば、クリベロマイセス・マキシアンス IFO 1090、クリベロマイセス・サーモトレランス ATCC 24177、クリベロマイセス・ウィッケラミイ、ATCC 24178、ザイゴサッカロマイセス・ルキシー NFR 2007、ザイゴサッカロマイセス・バイリー ATCC 8766、ザイゴサッカロマイセス・シードリ ATCC 46819、パフィア・ジャジニー IFO 0987、サッカロマイセス・セレビシエ協会 701 号 (清酒酵母) 等が好適に用いられる。

これら微生物は、いずれも単独でまたは混合して用いることができる。

これらの微生物を人工的変異法、例えば紫外線照射、X線照射、変異誘起剤処理、遺伝子操作などで変異させて得られる変異株あるいは自然に変異した変異株でも、上述の活性を有する微生物であれば、本発明に用いることができる。

これらの微生物の培養に用いられる培地としては、乳酸菌、ビフィズス菌または酵母等の培養に通常用いられる培地であれば、炭素源、窒素源、無機物、微量成分などを含有する合成培地、天然培地等、いずれも用いることができる。

炭素源としては、澱粉、デキストリン、シュクロース、グルコース、マンノ

ース、フルクトース、ラフィノース、ラムノース、イノシトール、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜、ビルビン酸などがあげられこれらを単独または組合せて用いることができる。使用量は1～20 g/Lが好ましい。

窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどのアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等の硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、コーン・スティーブ・リカー、カゼイン分解物、大豆粉、野菜ジュース、カザミノ酸、尿素、などの窒素含有有機物などがあげられ、これらを単独または組合せて用いることができる。使用量は1～20 g/Lが好ましい。

無機物としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅などがあげられ、これらを単独または組合せて用いることができる。使用量は0.1～2 g/Lが好ましい。

微量成分としては、ビオチン、サイアミン、ニコチン酸等のビタミン類、 $\beta$ -アラニン、グルタミン酸等のアミノ酸類などがあげられ、これらを単独または組合せて用いることができる。使用量は0.0001～2 g/Lが好ましい。

培養法としては、液体培養法、特に深部攪拌培養法が好ましい。培地は、pH 2～11、好ましくはpH 3～10、より好ましくはpH 4～8に調整し、10～80℃、好ましくは10～60℃、特に好ましくは20～40℃で、通常6時間～7日間培養する。培地のpH調整にはアンモニア水や炭酸アンモニウム溶液などが用いられる。

本発明に用いる培養液の処理物としては、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸の、 $[n-5]$  にヒドロキシを $[n-6]$  位に水素を導入し $[n-6]$  位を単結合とする活性を有する微生物の菌体、該微生物を含有する培養液またはそれらの処理物等があげられる。

該微生物の菌体処理物としては、該微生物の菌体の乾燥物、冷凍物、冷蔵物、



凍結乾燥物、加熱物、加圧物、超音波破碎物、界面活性剤または有機溶剤処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体あるいは菌体から抽出または精製して得られる酵素等があげられる。

菌体から酵素を抽出または精製する方法としては、タンパク質の一般的な抽出、精製方法を用いることができる。酵素は、例えば菌体をホモジナイザー、ガラスビーズ、アンモニア溶解、酵素法などを用いて抽出し、ろ過、遠心分離、塩析、有機溶媒沈殿、免疫沈降などの方法を用いる他、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、電気泳動法、吸着剤、アフィニティー吸着体、分子篩などを用いたクロマトグラフィー法、液相分配法、イオン交換法、バッチ法、結晶化法などの手法を単独または組み合わせて用いて精製することができる。

該微生物を含有する培養液としては、培養終了後に得られる培養液をそのまま用いてもよいが、濃縮、乾燥、冷凍、冷蔵、凍結乾燥、加熱、加圧、超音波破碎、界面活性剤もしくは有機溶媒処理、または溶菌酵素処理などの手法を単独または組合せて処理物を取得し、これを用いてもよい。

次に、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸の製造方法および  $\delta$ -ラクトン類の製造方法について述べる。

第一の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸または該脂肪酸を含む組成物に作用させ、生成する  $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を採取することにより、 $[n-6]$  位が単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を製造することができる。具体的には、以下の様にして製造することができる。

該微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物と、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸または該脂肪酸を含む組成物とを、必要に応じて水等の水性媒体を加えた上で、 $10 \sim 80^\circ\text{C}$ 、好ましくは  $20 \sim 40^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 2 \sim 11$ 、好ましくは  $\text{pH } 3 \sim 10$ 、より好ましくは  $\text{pH } 5 \sim 8$  で、6 時間～7 日間、好ましくは 1～4 日間反応させる。

反応液中には、必要に応じて、緩衝液、界面活性剤、有機溶剤、抗酸化剤等

を添加してもよい。

緩衝液としては、例えばリン酸緩衝液、クエン酸緩衝液等をあげることができる。緩衝液の濃度は0.01～1mol/Lが好ましい。

界面活性剤としては、例えばショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル等をあげることができる。界面活性剤の濃度としては、0.1～5%が好ましい。

有機溶剤としては、エタノール等をあげることができる。有機溶剤の濃度としては、1～50g/Lが好ましい。

抗酸化剤としては、食品に利用可能な抗酸化剤があげられ、例えば $\alpha$ -トコフェロール、ビタミンE、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)、脱脂粉乳等があげられる。抗酸化剤の濃度としては、0.01～50g/Lが好ましい。

微生物の菌体を用いる場合は、第一の微生物を炭素源、窒素源等を含有する5～50mLの培地に1～3白金耳植菌し、1～5日間静置培養して得られる種培養液を、n(nは10以上の偶数)個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の[n-6]位が二重結合である脂肪酸または該脂肪酸を含有する組成物に0.1～5%植菌し、静置または低速で攪拌培養を行う。培養温度は、[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸に変換可能な温度であれば、第一の微生物は増殖してもしなくてもよく、好ましくは、5～40℃である。培養時間は条件により異なるが、通常1～4日間程度である。

反応液中または培養物中に含まれる、n(nは10以上の偶数)個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の[n-6]位が二重結合である脂肪酸から変換される[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸を抽出および検出する方法としては、通常の脂質の抽出方法および薄層クロマトグラフィー(TLC)による脂質の検出方法を用いることができる。すなわち、約0.2～10mLの反応液に約30～80重量%のクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)などの溶媒を添加して10分間振とうした後、遠心分離を行って溶媒層を脂質抽出液として分取する。分取した脂質抽出液1

～20  $\mu$ lをシリカゲルプレコートTLCプレートにスポットして適当な溶媒系を用いて展開後、適当な発色剤により発色させる。プレート上の発色により、[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸を検出することができる。

TLCプレートとしては、例えばTLCガラスプレート60 (No. 5721、メルク社製)等が用いられる。

反応液または培養物から[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸を単離、精製するには、脂質を単離、精製するための通常の方法が用いられる。すなわち、ろ過、遠心分離などによる菌体除去、ジエチルエーテル／トルエン(15:85～60:40, v/v)などの溶媒による脂質抽出、吸着樹脂、シリカゲル、逆相シリカゲル、酸化アルミニウム、セルロース、ケイ藻土、ケイ酸マグネシウム、ゲル濾過剤、イオン交換樹脂などを用いるカラムクロマトグラフィーもしくは薄層クロマトグラフィーによる脂質の吸脱着処理、または適当な溶媒系による分配などを行うことによって、[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸を単離、精製することができ、純度が約90～100%のものを得ることができる。

[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸は、上述の方法で薄層クロマトグラフィーを行うことにより検出することができる。

また、[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸は、例えば以下の条件で高速液体クロマトグラフィーを行うことにより、定量することができる。

装置: SPD-10A (島津製作所製)

カラム: TSK-gel ODS-80Ts (東ソー製)、

移動相: A液: アセトニトリル／水／酢酸

(28:72:0.02, v/v/v)

B液: アセトニトリル／水／酢酸

(52:48:0.02, v/v/v)

A液(10分)、A液→B液(60分 直線濃度勾配)、B液(30分)

流量: 2ml/分、温度: 40℃、検出: UV-200nm

[n-6] 位が単結合の [n-5] -ヒドロキシ脂肪酸は、食品添加物等として有用な  $\delta$ -ラクトン類の製造に用いることができる。

以下に、[n-6] 位が単結合の [n-5] -ヒドロキシ脂肪酸から  $\delta$ -ラクトン類の製造方法について述べる。

第二の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物と、上述の方法により製造される [n-6] 位が単結合の [n-5] -ヒドロキシ脂肪酸を含有する反応液、該反応液処理物または該反応液から単離した [n-6] 位が単結合の [n-5] -ヒドロキシ脂肪酸とを、必要に応じて水等の水性媒体を加えた上で、10~80℃、好ましくは20~50℃、pH2~9、好ましくはpH3~8、より好ましくはpH4~7の条件下で12時間~7日間、より好ましくは1~4日間、特に好ましくは2~3日間反応させる。

[n-6] 位が単結合の [n-5] -ヒドロキシ脂肪酸を含有する反応液処理物とは、[n-6] 位が単結合の [n-5] -ヒドロキシ脂肪酸を含有する反応液を単離、精製する過程で得られる [n-6] 位が単結合の [n-5] -ヒドロキシ脂肪酸を含有する処理物をいう。

反応液には、必要に応じてさらに前述の緩衝液、界面活性剤、有機溶剤、抗酸化剤等を添加することができる。

微生物の菌体を用いる場合は、第二の微生物を炭素源、窒素源等を含有する5~50mLの培地に1~3白金耳植菌し、1~5日間静置培養して得られる種培養液、または100mL~1Lの培地に該種培養液を1~5%植菌して1~5日間静置培養して得られる種培養液を、[n-6] 位が単結合の [n-5] -ヒドロキシ脂肪酸を含有する反応液に0.1~50%植菌し、通気攪拌等により好氣的条件下で培養を行う。通気攪拌条件には特に限定はないが、通気は0.01~3vvm、攪拌は200~1200rpmであることが好ましい。培養温度は、[n-6] 位が単結合の [n-5] -ヒドロキシ脂肪酸を  $\delta$ -ラクトン類に変換可能な温度であれば微生物が成育しない温度でもよく、好ましくは5~35℃である。培養時間は条件により異なるが、通常12時間~7日間である。

第二の微生物との反応または培養終了後、反応液または培養物をpH1~6、

好ましくはpH 3～5に調整し、さらに5～80℃、好ましくは20～35℃で30分以上反応させると、 $\delta$ -ラクトン類の生成量を増大させることができる。該方法は、例えばサッカロマイセス・セレビシエやクリベロマイセス・マキシアンス等を第二の微生物とした場合に、好適に用いられる。

反応液または培養物から $\delta$ -ラクトン類を単離、精製するには、通常の溶媒抽出法等を用いることができる。すなわち、約0.2～10mlの反応液または培養液に約20～60重量%のペンタン／エーテル混合溶媒（5：95～80：20，v/v）と20～60重量%の飽和食塩水を添加して10分間振とうした後、遠心分離して得られる上清を分取することにより、 $\delta$ -ラクトン類を単離、精製することができる。

$\delta$ -ラクトン類は、例えば以下の条件でガスクロマトグラフィーを行うことにより、定量することができる。

装置：ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-QP5000（島津製作所製）

カラム：TC-WAX 60m 0.25mm×0.25 $\mu$ m、

ヘリウム流量：0.5ml/分、

カラム温度：40℃（0.5分）—5℃/分—240℃（69.5分）

圧力：50Kpa（0分）—5Kpa/分—300Kpa（60分）

$\delta$ -ラクトン類標準標品： $\delta$ -デカラクトン（アルドリッチ社製）、ジャスミンラクトン（日本ゼオン社製）

上記方法によって得られる、 $\delta$ -ラクトン類を含有する反応液または培養物は、そのまま、または必要により殺菌した後、もしくはろ過で固形物を除去した後、食品等に添加することができる。また、 $\delta$ -ラクトン類を精製した後、これを食品等に添加することができる。

$\delta$ -ラクトン類はいずれの食品に添加してもよいが、例えば乳飲料、乳加工品、畜産加工品、洋菓子、アイスクリーム、スナック等の菓子類、ホワイトソース、チーズソース、ドレッシング等の調味料類などに好適に添加される。

$\delta$ -ラクトン類は、食品における濃度が、約0.1～100ppm、好ましくは約0.25～20ppmとなるように、通常配合される。

以下に、本発明の実施例、比較例および試験例を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下の実施例において、FABマスペクトル測定および高分解能FABマスペクトル測定は、JMS-HX/HX110A（日本電子社製）を、NMR測定はJNM-A400（日本電子社製）を用いて、常法に従い行った。

##### 実施例1 ヒドロキシ脂肪酸の生成

リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、シス-11，シス-14-イコサジエン酸、シス-8，シス-11，シス-14-イコサトリエン酸、シス-11，シス-14，シス-17-イコサトリエン酸、シス-13，シス-16-ドコサジエン酸、シス-12-オクタデセン酸（以上、シグマ社製）を、各々0.5gずつ100mlの栄養培地（酵母エキス0.18g、ポリペプトン0.42g、60%液体グルコース0.62ml、pH6.5）に添加し、抗酸化剤としてイーミックス80（エーザイ製）を0.02ml、分散剤として脱脂粉乳を2g添加して、ペディオコッカス・ペントサセウス（*Pediococcus pentosaceus*）IFO3891の種培養液を3ml植菌し、25℃で2日間、80rpmで攪拌培養した。

培養終了後、各々の培養液0.5mlに、等量のクロロホルム/メタノール（2：1，v/v）溶媒を加えて脂質を抽出し、得られた脂質抽出液を5 $\mu$ lずつTLCガラスプレート・シリカゲル60（No. 5721、メルク社製）にスポットした。第1段回目の展開として、トルエン/ジエチルエーテル/エタノール/酢酸（50：40：2：0.2，v/v/v/v）を用いて20分間展開した後、プレートを乾燥させた。第2段回目の展開として、ヘキサン/ジエチルエーテル（94：6，v/v）を用いて35分間展開した後、プレートを乾燥させた。発色剤として、6g/100ml酢酸銅を含む8%（w/w）りん酸溶液を適量展開面に噴霧し、140℃で25分間加熱した。

結果を第1表に示す。

第1表

| 脂肪酸  | R f 値  |
|--|--------|
| リノール酸 (Linoleic acid)  | 0. 1 9 |
| $\gamma$ -リノレン酸 ( $\gamma$ -Linolenic acid)                                  | 0. 1 7 |
| $\alpha$ -リノレン酸 ( $\alpha$ -Linolenic acid)                                  | 0. 1 6 |
| シス-11, シス-14-イコサジエン酸<br>(cis-11, cis-14-Eicosadienoic acid)                  | 0. 1 8 |
| シス-8, シス-11, シス-14-イコサトリエン酸<br>(cis-8, cis-11, cis-14-Eicosatrienoic acid)   | 0. 1 8 |
| シス-11, シス-14, シス-17-イコサトリエン酸<br>(cis-11, cis-14, cis-17-Eicosatrienoic acid) | 0. 1 8 |
| シス-13, シス-16-イコサジエン酸<br>(cis-13, cis-16-Eicosadienoic acid)                  | 0. 2 0 |
| シス-12-オクタデセン酸 (cis-12-Octadecenoic acid)                                     | 0. 1 9 |

第1表に示されるとおり、いずれの脂肪酸を用いた場合でも、ヒドロキシ脂肪酸が、そのR f 値として期待される位置であるR f 値=0. 13~0. 22の位置に、褐色のスポットとして検出された。

#### 実施例2 リノール酸の水酸化物の製造

リノール酸5gを1000mlの栄養培地(酵母エキス1.8g、ポリペプトン4.2g、60%液体グルコース6.2mlを含む、pH6.5)に添加し、抗酸化剤としてイーミックス80を0.2ml、分散剤として脱脂粉乳を20g添加して、ペディオコッカス・ペントサセウスIFO3891の種培養液を30ml植菌し、25℃で2日間、80rpmで攪拌培養した。

得られた約1000mlの培養液に約120重量%のジエチルエーテル/トルエン(4:5, v/v)混合溶媒を添加して約20分間振とうした後、遠心分離して上清を分取し、これを脂質抽出液とした。脂質抽出液をロータリーエバポレーターで約50mlに濃縮した後、約80gのシリカゲル(Wako gel C-2000)の入った内径3.14cm×50cmのガラス管を用い、以下の方法により、カラムクロマトグラフィーを行った。

カラムを上記の混合溶媒 300 ml で洗浄した後、濃縮した脂質抽出液を添加し、上記の混合溶媒 500 ml を 3 ml / 分の速度で流し、5 ml ずつの画分に分けて溶出した。各溶出画分の脂質を、シリカゲルプレコート TLC プレート上で展開し、13-ヒドロキシ-9-オクタデセン酸 (13-hydroxy-9-octadecenoic acid) を検出、取得した。

[13-ヒドロキシ-9-オクタデセン酸の理化学的性質]

(1) 分子式:  $C_{18}H_{34}O_3$

(2) FABマスペクトル:  $m/z$  299 (M+H)<sup>+</sup>

(3) 高分解能FABマスペクトル:  $m/z$  299.2592 (M+H)<sup>+</sup>,  $C_{18}H_{35}O_3$  としての計算値 = 299.2586

(4)  $^{13}C$ -NMRスペクトル (100MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm (多重度), 179.2(s), 130.5(d), 129.3(d), 71.9(d), 37.4(t), 37.3(t), 34.0(t), 31.9(t), 29.7(t), 28.9(t), 28.9(t), 28.9(t), 27.1(t), 25.3(t), 24.7(t), 23.6(t), 22.6(t), 14.0(q)

(5)  $^1H$ -NMRスペクトル (400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm (積分、多重度、結合定数 J (Hz)), 5.38(1H, m), 5.38(1H, m), 3.63(1H, m), 2.33(2H, t, 7.4), 2.12(2H, m), 2.04(2H, q, 6.5), 1.63(2H, m), 1.52(2H, m), 1.52(2H, m), 1.44(2H, m), 1.31(2H, m), 1.31(2H, m), 1.31(2H, m), 1.31(2H, m), 1.31(2H, m), 1.31(2H, m), 0.89(3H, t, 6.8)

実施例3  $\alpha$ -リノレン酸の水酸化物 (13-hydroxy-9,15-octadecadienoic acid) の製造

リノール酸を  $\alpha$ -リノレン酸に代える以外は実施例2と同様に行い、13-ヒドロキシ-9,15-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-9,15-octadecadienoic acid) を取得した。

[13-ヒドロキシ-9,15-オクタデカジエン酸の理化学的性質]

(1) 分子式:  $C_{18}H_{32}O_3$

(2) FABマスペクトル:  $m/z$  297 (M+H)<sup>+</sup>

(3) 高分解能FABマスペクトル:  $m/z$  297.2421 (M+H)<sup>+</sup>,  $C_{18}H_{33}O_3$  としての計算値 = 297.2430

(4)  $^{13}C$ -NMRスペクトル (100MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  ppm (多重度), 178.3(s), 135.2(d),



130.6(d), 129.2(d), 124.4(d), 71.3(d), 36.7(t), 35.3(t), 33.9(t), 29.5(t), 28.9(t), 28.9(t), 28.9(t), 27.1(t), 24.7(t), 23.7(t), 20.7(t), 14.3(q)

(5)  $^1\text{H}$ -NMRスペクトル (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm (積分、多重度、結合定数J(Hz)), 5.56(1H, m), 5.38(1H, m), 5.37(1H, m), 5.37(1H, m), 3.65(1H, m), 2.34(2H, t, 7.4), 2.23(2H, t, 7.1), 2.15(2H, m), 2.07(2H, m), 2.03(2H, m), 1.64(2H, m, 7.1), 1.54(2H, m), 1.32(2H, m), 1.32(2H, m), 1.32(2H, m), 1.32(2H, m), 0.97(3H, t, 7.4)

#### 実施例4 $\gamma$ -リノレン酸の水酸化物 (13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid) の製造

リノール酸を $\gamma$ -リノレン酸に代える以外は実施例2と同様に行い、13-ヒドロキシ-6,9-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid) を得た。

[13-ヒドロキシ-6,9-オクタデカジエン酸の理化学的性質]

(1) 分子式:  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_3$

(2) FABマススペクトル:  $m/z$  297 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

(3) 高分解能FABマススペクトル:  $m/z$  297.2426 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ,  $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_3$ としての計算値=297.2430

(4)  $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm (多重度), 178.6(s), 129.6(d), 129.4(d), 128.4(d), 128.4(d), 71.8(d), 37.4(t), 37.1(t), 33.9(t), 31.9(t), 28.9(t), 26.8(t), 25.6(t), 25.3(t), 24.4(t), 23.6(t), 22.6(t), 14.0(q)

(5)  $^1\text{H}$ -NMRスペクトル (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  ppm (積分、多重度、結合定数J(Hz)), 5.38(1H, m), 5.38(1H, m), 5.38(1H, m), 5.38(1H, m), 3.64(2H, m), 2.80(2H, t, 5.6), 2.35(2H, t, 7.3), 2.18(2H, m), 2.09(2H, q, 7.5), 1.67(2H, m), 1.55(2H, m), 1.45(2H, m), 1.45(2H, m), 1.42(2H, m), 1.31(2H, m), 1.31(2H, m), 0.89 (3H, t, 6.8)

#### 実施例5

リノール酸を0.5gを100mlの栄養培地 (酵母エキス0.18g、ポリペプトン0.42g、60%液体グルコース0.62ml、pH6.5) に添加し、抗酸化剤としてイーミックス80を0.02ml、分散剤として脱脂粉

乳を2 g添加して、第一の微生物としてペディオコッカス・ペントサセウス I F O 3 8 9 1 の種培養液を3 m l 植菌し、2 5℃で2日間、8 0 r p mで攪拌培養した。

培養終了後、培養液0. 5 m lに、等量のクロロホルム/メタノール(2 : 1, v/v) 溶媒を加えて脂質を抽出し、得られた脂質抽出液を5  $\mu$  l ずつ T L C ガラスプレート・シリカゲル6 0 に5  $\mu$  l スポットした。第1段回目の展開として、トルエン/ジエチルエーテル/エタノール/酢酸(5 0 : 4 0 : 2 : 0. 2, v/v/v/v) を用いて2 0 分間展開した後、プレートを乾燥させた。第2段回目の展開溶媒として、ヘキサン/ジエチルエーテル(9 4 : 6, v/v) を用いて3 5 分間展開した後、プレートを乾燥させた。発色剤として、6 g/1 0 0 m l 酢酸銅を含む8 % (w/w) りん酸溶液を適量展開面に噴霧し、1 4 0℃で2 5 分間加熱した。

その結果、リノール酸から変換されたヒドロキシ脂肪酸が、R f 値=0. 1 9 の位置に、褐色のスポットとして検出された。

#### 実施例 6

$\alpha$ -リノレン酸0. 5 gを1 0 0 m l の栄養培地(酵母エキス0. 1 8 g、ポリペプトン0. 4 2 g、6 0 %液体グルコース0. 6 2 m l、pH 6. 5) に添加し、抗酸化剤としてイーミックス8 0 を0. 0 2 m l、分散剤として脱脂粉乳を2 g添加して、第一の微生物としてペディオコッカス・ペントサセウス I F O 3 8 9 1 の種培養液を3 m l 植菌し、2 5℃で2日間8 0 r p mで攪拌培養した。

培養終了後、実施例1と同様にして培養液からの脂質抽出および薄層クロマトグラフィーを行い、 $\alpha$ -リノレン酸から変換されたヒドロキシ脂肪酸の検出を行った。

その結果、R f 値=0. 1 6 の位置に、ヒドロキシ脂肪酸が褐色のスポットとして検出された。

#### 実施例 7

$\gamma$ -リノレン酸0. 5 gを1 0 0 m l の栄養培地(酵母エキス0. 1 8 g、ポリペプトン0. 4 2 g、6 0 %液体グルコース0. 6 2 m l、pH 6. 5)

に添加し、抗酸化剤としてイーミックス80を0.02ml、分散剤として脱脂粉乳を2g添加して、第一の微生物としてペディオコッカス・ペントサセウスIFO3891の種培養液を3ml植菌し、25℃で2日間80rpmで攪拌培養した。

培養終了後、実施例1と同様にして培養液からの脂質抽出および薄層クロマトグラフィーを行い、 $\gamma$ -リノレン酸から変換されたヒドロキシ脂肪酸の検出を行った。

その結果、Rf値=0.17の位置に、ヒドロキシ脂肪酸が褐色のスポットとして検出された。

#### 実施例8

リノール酸5gを1Lの栄養培地（酵母エキス1.8g、ポリペプトン4.2g、60%液体グルコース6.2ml、pH6.5）に添加し、抗酸化剤としてイーミックス80を0.2ml、分散剤として脱脂粉乳を20g添加して、ペディオコッカス・ペントサセウスIFO3891の種培養液を30ml植菌し、25℃で2日間、400rpmで攪拌培養した。

培養終了後、得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス (*Kluyveromyces marxianus*) IFO1090の種培養液を30ml植菌し、25℃で4日間、900rpm、1vvmで通気攪拌培養を行なった。

その結果、培養物中に245ppmの $\delta$ -デカラクトンが得られた。

#### 実施例9

$\alpha$ -リノレン酸5gを1Lの栄養培地（酵母エキス1.8g、ポリペプトン4.2g、60%液体グルコース6.2ml、pH6.5）に添加し、抗酸化剤としてイーミックス80を0.2ml、分散剤として脱脂粉乳を20g添加して、ペディオコッカス・ペントサセウスIFO3891の種培養液を30ml植菌し、25℃で2日間、400rpmで攪拌培養した。

培養終了後、得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス (*Kluyveromyces marxianus*) IFO1090の種培養液を30ml植菌し、25℃で4日間、900rpm、1vvmで通気攪拌培養を行なった。

その結果、培養物中に103ppmのジャスミンラクトンが得られた。

### 実施例 10

930mlの水にコーン油（味の素社製）を40ml添加し、抗酸化剤としてイーミックス80を0.2ml、加水分解酵素リパーゼMY（名糖産業社製）を0.4g添加して、40℃で24時間加水分解処理をした。得られた加水分解コーン油に、脱脂粉乳20g、酵母エキス1.8g、ポリペプトン4.2g、60%液体グルコース6.2mlを添加した後、pHを6.5に調整し、ペディオコッカス・ペントサセウスIFO3891の種培養液を30ml植菌し、25℃で2日間、400rpmで攪拌培養した。

培養終了後、得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス (*Kluyveromyces marxianus*) IFO1090の種培養液を30ml植菌し、25℃で4日間、900rpm、1vvmで通気攪拌培養を行なった。

その結果、培養物中に392ppmの $\delta$ -デカラクトンが得られた。

### 実施例 11

実施例10と同様にして調製された加水分解コーン油を含有する培地に、ペディオコッカス・エスピー (*Pediococcus* sp.) IFO3778の種培養液を30ml植菌し、25℃で2日間、400rpmで攪拌培養した。

培養終了後、得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス IFO1090の種培養液を30ml植菌し、25℃で4日間、900rpm、1vvmで通気攪拌培養を行なった。

その結果、培養物中に173ppmの $\delta$ -デカラクトンが得られた。

### 実施例 12

実施例10と同様にして調製された加水分解コーン油を含有する培地に、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*) JCM7002の種培養液を30ml植菌し、25℃で2日間、400rpmで攪拌培養した。

培養終了後、得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス IFO1090の種培養液を30ml植菌し、25℃で4日間、900rpm、1vvmで通気攪拌培養を行なった。

その結果、培養物中に115ppmの $\delta$ -デカラクトンが得られた。

### 実施例 13

実施例 10 と同様にして調製された加水分解コーン油を含有する培地に、ペディオコッカス・ペントサセウス I F O 3 8 9 1 の種培養液を 3 0 m l 植菌し、2 5℃で2日間4 0 0 r p mで攪拌培養した。

培養終了後、得られた培養液にサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 協会 7 0 1 号の種培養液を 3 0 m l 植菌し、2 5℃で4日間、9 0 0 r p m、1 v v mで通気攪拌培養を行った。

その結果、培養液中に 2 3 p p mの $\delta$ -デカラクトンが得られた。さらに、培養液に 9 0 %乳酸（株）武蔵野化学研究所製）を添加して p H 3 に調整した後、2 5℃、3 0 分間静置して反応させた。その結果、反応液中に 1 9 7 p p mの $\delta$ -デカラクトンが得られた。

#### 実施例 1 4

実施例 10 と同様にして調製された加水分解コーン油を含有する培地に、ペディオコッカス・ペントサセウス I F O 3 8 9 1 の種培養液を 3 0 m l 植菌し、2 5℃で2日間、4 0 0 r p mで攪拌培養した。

培養終了後、得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンス I F O 1 0 9 0 の種培養液を 3 0 m l 植菌し、2 5℃で4日間、9 0 0 r p m、1 v v mで通気攪拌培養を行った。

その結果、培養液中に 3 7 8 p p mの $\delta$ -デカラクトンが得られた。さらに、培養液に 9 0 %乳酸を添加して p H 3 に調整した後、2 5℃、3 0 分間静置して反応させた。

その結果、反応液中に 7 8 3 p p mの $\delta$ -デカラクトンが得られた。

#### 実施例 1 5

4 6 5 m l の水にコーン油（味の素社製）を 2 0 m l 添加し、抗酸化剤としてイーミックス 8 0 を 0. 1 m l、加水分解酵素リパーゼ M Y（名糖産業社製）を 0. 2 g 添加して 4 0℃で24時間加水分解処理をした。得られた加水分解コーン油に、脱脂粉乳を 1 0 g、酵母エキス 0. 9 g、ポリペプトン 2. 1 g、6 0 %液体グルコース 3. 1 m l を添加し、p H を 6. 5 に調整し、ペディオコッカス・ペントサセウス I F O 3 8 9 1 の種培養液を 1 5 m l 植菌し、2 5℃で2日間、4 0 0 r p mで攪拌培養した。

培養終了後、得られた培養液に栄養培地で2日間培養したクリベロマイセス・マキシアンズ IFO1090の種培養液500mlを混合し、25℃で2日間、900rpm、1vvmで通気攪拌培養を行なった。

その結果、培養物中に502ppmの $\delta$ -デカラクトンが得られた。

#### 実施例16

実施例10で得られた培養物を85℃、1分間の殺菌処理した後、0.6mlを市販のコーンクリームスープ200gに添加した。このスープ中の $\delta$ -デカラクトンの濃度は1.18ppmであった。 $\delta$ -デカラクトンを含有させた結果、まろやかなミルク感のあるコーンクリームスープとなった。

#### 実施例17

実施例10で得られた培養物を85℃、1分間の殺菌処理した後、0.3mlを市販の低脂肪乳200mlに添加した。低脂肪乳中の $\delta$ -デカラクトン濃度は0.59ppmであった。 $\delta$ -デカラクトンを含有させた結果、粉乳臭がマスキングされ、ミルク香の改善された低脂肪乳となった。

#### 実施例18

豆乳500mlに乳酸菌としてペディオコッカス・ペントサセウス IFO3891を15ml植菌し、25℃で1日間静置培養した。

培養終了後、得られた培養液にクリベロマイセス・マキシアンズ IFO1090を15ml植菌し、25℃で2日間、900rpm、1vvmで通気攪拌培養を行なった。

その結果、培養物中に2.7ppmの $\delta$ -デカラクトンが得られた。また、該培養物は青臭がマスキングされ、風味の改善された発酵豆乳となった。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、n (nは10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の[n-6]位が二重結合である脂肪酸から[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸の製造方法が提供される。また、n (nは10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の[n-6]位が二重結合である脂肪酸から[n-6]位が

単結合の  $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を経て  $\delta$ -ラクトン類を製造する方法が提供される。さらに、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸を含有する組成物から  $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物の製造方法が提供される。

本発明によれば、微生物の菌体、培養液またはこれらの処理物により安価な食品原料に由来するリノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸および $\gamma$ -リノレン酸等の脂肪酸から工業的に有用な  $\delta$ -ラクトン類を大量かつ容易に製造することができる。

## 請求の範囲

1.  $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸の、 $[n-5]$  位にヒドロキシを $[n-6]$  位に水素を導入し $[n-6]$  位を単結合とする活性を有する微生物(以下、第一の微生物という)の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸または該脂肪酸を含有する組成物に作用させ、 $[n-6]$  位が単結合の $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を生成させ、生成した $[n-6]$  位が単結合の $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸を採取することを特徴とする $[n-6]$  位が単結合の $[n-5]$  -ヒドロキシ脂肪酸の製造方法。
2.  $[n-6]$  位の二重結合がシス体である、請求の範囲1記載の方法。
3. 第一の微生物がリノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸または $\gamma$ -リノレン酸の13位にヒドロキシを12位に水素を導入し12位を単結合とする活性を有する微生物である、請求の範囲1または2記載の方法。
4. 第一の微生物が乳酸菌またはビフィズス菌である、請求の範囲1~3のいずれかに記載の方法。
5. 第一の微生物がペディオコッカス(Pediococcus) 属またはビフィドバクテリウム(Bifidobacterium) 属に属する微生物である、請求の範囲1~3のいずれかに記載の方法。
6. 第一の微生物がペディオコッカス・ペントサセウス(Pediococcus pentosaceus) またはビフィドバクテリウム・ビフィダム(Bifidobacterium bifidum) である、請求の範囲1~3のいずれかに記載の方法。
7. 第一の微生物がペディオコッカス・ペントサセウス IFO 3891、ペディオコッカス・エスピー(Pediococcus sp.) IFO 3778またはビフィドバクテリウム・ビフィダム JCM 7002である、請求の範囲1~3のいずれかに記載の方法。
8.  $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸がリノール酸であり、



〔 $n-6$ 〕位が単結合の〔 $n-5$ 〕-ヒドロキシ脂肪酸が13-ヒドロキシ-9-オクタデセン酸 (13-hydroxy-9-octadecenoic acid) である請求の範囲1～7のいずれかに記載の方法。

9.  $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の〔 $n-6$ 〕位が二重結合である脂肪酸が $\alpha$ -リノレン酸であり、〔 $n-6$ 〕位が単結合の〔 $n-5$ 〕-ヒドロキシ脂肪酸が13-ヒドロキシ-9,15-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-9,15-octadecadienoic acid) である請求の範囲1～7のいずれかに記載の方法。

10.  $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の〔 $n-6$ 〕位が二重結合である脂肪酸が $\gamma$ -リノレン酸であり、〔 $n-6$ 〕位が単結合の〔 $n-5$ 〕-ヒドロキシ脂肪酸が13-ヒドロキシ-6,9-オクタデカジエン酸 (13-hydroxy-6,9-octadecadienoic acid) である請求の範囲1～7のいずれかに記載の方法。

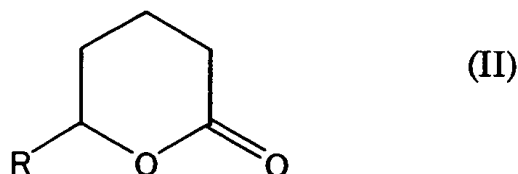
11. 式 (I)



で表される13-ヒドロキシ-6,9-オクタデカジエン酸。

12. 第一の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$ は10以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の〔 $n-6$ 〕位が二重結合である脂肪酸または該脂肪酸を含む組成物に作用させ〔 $n-6$ 〕位が単結合の〔 $n-5$ 〕-ヒドロキシ脂肪酸を生成させ、次いで、〔 $n-6$ 〕位が単結合の〔 $n-5$ 〕-ヒドロキシ脂肪酸を $\beta$ 酸化する活性を有する微生物（以下、第二の微生物という）の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させ、生成する $\delta$ -ラクトン類を採取することを特徴とする、 $\delta$ -ラクトン類の製造方法。

13.  $\delta$ -ラクトン類が式 (II)



(式中、Rはn-ペンチルまたはn-ペンテニルを表す) で表される $\delta$ -ラクトン類である、請求の範囲12記載の方法。

14.  $\delta$ -ラクトン類が $\delta$ -デカラクトンまたはジャスミンラクトンである、請求の範囲12記載の方法。

15. [n-6]位の二重結合がシス体である、請求の範囲12～14のいずれかに記載の方法。

16. 第一の微生物がリノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸または $\gamma$ -リノレン酸の13位にヒドロキシを12位に水素を導入し12位を単結合とする活性を有する微生物である、請求の範囲12～15のいずれかに記載の方法。

17. 第一の微生物が乳酸菌またはビフィズス菌である、請求の範囲12～15のいずれかに記載の方法。

18. 第一の微生物が、ペディオコッカス属またはビフィドバクテリウム属に属する微生物である、請求の範囲12～15のいずれかに記載の方法。

19. 第一の微生物がペディオコッカス・ペントサセウスまたはビフィドバクテリウム・ビフィダムである、請求の範囲12～15のいずれかに記載の方法。

20. 第一の微生物がペディオコッカス・ペントサセウスIFO3891、ペディオコッカス・エスピーIFO3778またはビフィドバクテリウム・ビフィダムJCM7002である、請求の範囲12～15のいずれかに記載の方法。

21. 第二の微生物が酵母である、請求の範囲12～20のいずれかに記載の方法。

22. 第二の微生物がクリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、ザイゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属、パフィア (*Pichia*) 属またはサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属に属する微生物である、請求の範囲12～20のいずれか

に記載の方法。

23. 第二の微生物がクリベロマイセス・マキシアンス (Kluyveromyces marxianus)、クリベロマイセス・サーモトレランス (Kluyveromyces thermotolerans)、クリベロマイセス・ウィッケラミイ (Kluyveromyces wickerhamii)、ザイゴサッカロマイセス・ルキシー (Zygosaccharomyces rouxii)、ザイゴサッカロマイセス・バイリー (Zygosaccharomyces bailii)、ザイゴサッカロマイセス・シードリ (Zygosaccharomyces cidri)、パフィア・ジャジニー (Pichia jadinii)、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) である、請求の範囲 12～20 のいずれかに記載の方法。

24. 第二の微生物がクリベロマイセス・マキシアンス IFO1090、クリベロマイセス・サーモトレランス ATCC24177、クリベロマイセス・ウィッケラミイ、ATCC24178、ザイゴサッカロマイセス・ルキシー NF R2007、ザイゴサッカロマイセス・バイリー ATCC8766、ザイゴサッカロマイセス・シードリ ATCC46819、パフィア・ジャジニー IFO0987、サッカロマイセス・セレビシエ協会 701 号である、請求の範囲 12～20 のいずれかに記載の方法。

25.  $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸がリノール酸であり、 $\delta$ -ラクトン類が $\delta$ -デカラクトンである、請求の範囲 12～24 のいずれかに記載の方法。

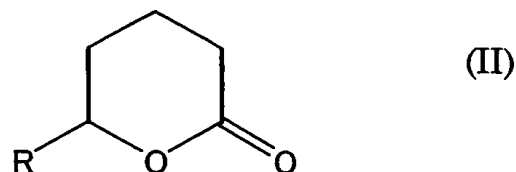
26.  $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸が $\alpha$ -リノレン酸であり、 $\delta$ -ラクトン類がジャスミンラクトンである、請求の範囲 12～24 のいずれかに記載の方法。

27. 組成物が天然油脂または天然油脂の加水分解物である、請求の範囲 12～26 のいずれかに記載の方法。

28. 第一の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を、 $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸を含有する組成物に作用させ、該組成物中

に〔n-6〕位が単結合の〔n-5〕-ヒドロキシ脂肪酸を生成させ、次いで、第二の微生物の菌体、培養液またはそれらの処理物を作用させることを特徴とする、 $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物の製造方法。

29.  $\delta$ -ラクトン類が式 (II)



(式中、Rはn-ペンチルまたはn-ペンテニルを表す) で表される $\delta$ -ラクトン類である、請求の範囲28記載の方法。

30.  $\delta$ -ラクトン類が $\delta$ -デカラクトンまたはジャスミンラクトンである、請求の範囲29記載の方法。

31. 〔n-6〕位の二重結合がシス体である、請求の範囲28～30のいずれかに記載の方法。

32. 第一の微生物がリノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸または $\gamma$ -リノレン酸の13位にヒドロキシを12位に水素を導入し12位を単結合とする活性を有する微生物である、請求の範囲28～31のいずれかに記載の方法。

33. 第一の微生物が乳酸菌またはビフィズス菌である、請求の範囲28～31のいずれかに記載の方法。

34. 第一の微生物が、ペディオコッカス属またはビフィドバクテリウム属に属する微生物である、請求の範囲28～31のいずれかに記載の方法。

35. 第一の微生物がペディオコッカス・ペントサセウスまたはビフィドバクテリウム・ビフィダムである、請求の範囲28～31のいずれかに記載の方法。

36. 第一の微生物がペディオコッカス・ペントサセウスIFO3891、ペディオコッカス・エスピーIFO3778またはビフィドバクテリウム・ビフィダムJCM7002である、請求の範囲28～31のいずれかに記載の方法。

37. 第二の微生物が酵母である、請求の範囲28～36のいずれかに記載の

方法。

38. 第二の微生物がクリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、ザイゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属、パフィア (*Pichia*) 属またはサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属に属する微生物である、請求の範囲 28～36 のいずれかに記載の方法。

39. 第二の微生物がクリベロマイセス・マキシアンス (*Kluyveromyces marxianus*)、クリベロマイセス・サーモトレランス (*Kluyveromyces thermotolerans*)、クリベロマイセス・ウィッケラミイ (*Kluyveromyces wickerhamii*)、ザイゴサッカロマイセス・ルキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*)、ザイゴサッカロマイセス・バイリー (*Zygosaccharomyces bailii*)、ザイゴサッカロマイセス・シードリ (*Zygosaccharomyces cidri*)、パフィア・ジャジニー (*Pichia jadinii*)、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である、請求の範囲 28～36 のいずれかに記載の方法。

40. 第二の微生物がクリベロマイセス・マキシアンス IFO1090、クリベロマイセス・サーモトレランス ATCC24177、クリベロマイセス・ウィッケラミイ、ATCC24178、ザイゴサッカロマイセス・ルキシー NFR2007、ザイゴサッカロマイセス・バイリー ATCC8766、ザイゴサッカロマイセス・シードリ ATCC46819、パフィア・ジャジニー IFO0987、サッカロマイセス・セレビシエ協会 701 号である、請求の範囲 28～36 のいずれかに記載の方法。

41.  $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸がリノール酸であり、 $\delta$ -ラクトン類が  $\delta$ -デカラクトンである、請求の範囲 28～40 のいずれかに記載の方法。

42.  $n$  ( $n$  は 10 以上の偶数) 個の炭素数よりなる直鎖脂肪酸であって、少なくとも該脂肪酸の  $[n-6]$  位が二重結合である脂肪酸が  $\alpha$ -リノレン酸であり、 $\delta$ -ラクトン類がジャスミンラクトンである、請求の範囲 28～40 のいずれかに記載の方法。

43. 組成物が食品である、請求の範囲 28～42 のいずれかに記載の方法。

44. 請求の範囲 12～27 のいずれかに記載の方法で製造される  $\delta$ -ラクトン類または請求の範囲 28～42 のいずれかに記載の方法で製造される  $\delta$ -ラクトン類を含有する組成物を食品に添加することを特徴とする、 $\delta$ -ラクトン類を含有する食品の製造方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04535

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/64, C07C59/42, C12P17/06, A23L1/03 // (C12P7/64, C12R1:01),  
(C12P17/06, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IntCl<sup>7</sup> C12P7/64, C07C59/42, C12P17/06, A23L1/03

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALIG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | EP, 409321, A (QUEST INT BV),<br>23 October, 1991 (23.10.91),<br>& CA, 2021270, A & JP, 3-219886, A<br>& US, 5215901, A & DE, 69012471, E                           | 1-44                  |
| A         | EP, 412880, A (PERNOD RICARD SA),<br>13 February, 1991 (13.02.91),<br>& JP, 3-187387, A & IT, 1232906, B<br>& US, 5168054, A & DE, 69023715, E<br>& ES, 2080135, T3 | 1-44                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 October, 2000 (06.10.00)

Date of mailing of the international search report  
17 October, 2000 (17.10.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04535

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Inventions as set forth in claims 1 to 10 and 12 to 44 pertain to processes for producing [n-5]-hydroxyfatty acids having a single bond at the [n-6]-position, etc.
2. Invention as set forth in claim 11 pertains to 13-hydroxy-6, 9-octadecadienoic acid.

There is no technical matter common to all of these inventions and thus the above groups of inventions 1 and 2 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P 7/64, C07C 59/42, C12P 17/06, A23L 1/03 // (C12P 7/64, C12R 1:01), (C12P 17/06, C12R 1:645)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P 7/64, C07C 59/42, C12P 17/06, A23L 1/03

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | EP, 409321, A (QUEST INT BV) 23. 10月. 1991 (23. 10. 91)<br>& CA, 2021270, A & JP, 3-219886, A & US, 5215901, A<br>& DE, 69012471, E                      | 1-44             |
| A               | EP, 412880, A (PERNOD RICARD SA) 13. 2月. 1991 (13. 02. 91)<br>& JP, 3-187387, A & IT, 1232906, B & US, 5168054, A<br>& DE, 69023715, E & ES, 2080135, T3 | 1-44             |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 10. 00

国際調査報告の発送日

17.10.00

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
高堀 栄二

4B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 請求の範囲1-10、12-44は、[n-6]位が単結合の[n-5]-ヒドロキシ脂肪酸の製造方法等に関するものである。
2. 請求の範囲11は、13-ヒドロキシ-6, 9-オクタデカジエン酸に関するものである。

上記請求の範囲の全てに共通の事項はなく、上記1~2の発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。